진주종상피에서 Apoptosis를 통한 세포의 사멸기전

아주대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,[2]
건국대학교 의과대학 이비인후과학교실[3]
박홍준[1] · 박기현[1] · 김보형[3] · 정연훈[1] · 정명현[2]

Mechanism of Apoptotic Cell Death in Cholesteatoma Epithelium

Hong-Joon Park, MD, PhD[1], Keehyun Park, MD, PhD[1], Bo Hyung Kim, MD[3], Yun Hoon Choung, MD[1] and Myung-Hyun Chung, MD, PhD[2]

[1]Department of Otolaryngology, Ajou University School of Medicine, Suwon, [2]Department of Otorhinolaryngology, Yousei University College of Medicine, Seoul, [3]Department of Otolaryngology, Kunkook University College of Medicine, Chungju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives：Accumulation of keratin debris in the middle ear is one of the characteristics of the cholesteatoma. It is related to increased rate of cell death and differentiation of keratinocytes compare to normal skin. This kind of cell death is known as apoptosis. In this study, we plan to investigate the apoptotic cell death and expression of Fas in both normal and cholesteatoma epithelia. **Materials and Methods**：Seven cholesteatomas and retroauricular skins were obtained from patients undergoing middle ear operations. Detection of the fragmented DNA in apoptosis was done by in situ TUNEL methods and agarose gel electrophoresis. For the morphologic confirmation of apoptosis, transmission electron microscopy (TEM) was done. Immunohistochemistry was also performed for detection of Fas expression on the tissue. **Results**：In TUNEL staining, many positive staining nuclei were observed in upper layers of cholesteatoma epithelium whereas a few positive cells were found on the granular layer of retroauricular skin. Typical "ladder pattern" was seen on the gel electrophoresis of the genomic DNA of cholesteatoma. On TEM study, we observed condensation of chromatin in the keratinocytes of the cholesteatoma epithelium. Immunohistochemical studies revealed that Fas protein was expressed in all layers of cholesteatoma epithelium, while retroauricular skin showed weak reactions only in the granular layer. **Conclusion**：We confirmed that increased apoptosis and up-regulated expression of Fas in cholesteatoma epithelium. Since Fas is known as apoptosis triggering protein, the authors suggest that accumulation of keratin debris is due to increased apoptotic cell death and further investigation should be needed about the mechanism of cell death in cholesteatoma. **(Korean J Otolaryngol 1998;41(4):425-429)**

KEY WORDS：Cholesteatoma epithelium · Cell death · Apoptosis · Fas.

서 론

중이진주종은 상피조직의 과증식반응과 분화 및 중이강내에 keratin debri의 축적이 병리학적 특성으로 알려져 있다. 진주종상피세포의 과증식에 대한 연구는 상피내에 성장인자나 그 수용체의 발현에 대한 보고가 있으며[1-3] cytokeratin을 대상으로 분화에 대한 연구[4)5)]가 지속되어왔으나 체계적인 세포사멸에 관한 보고는 이루어 지지않고 있는 실정이다.

정상상피는 각질세포로 이루진 여러 세포층으로 이루어져 있으며 각질세포는 기저층으로부터 지속적인 분화를 일으켜 각질층으로 떨어져나가고 분화와 사멸의 두 과정은 균형을 이루게 된다. 이러한 분화의 최후과정인 세포사멸은 apoptosis의 특수한 형태로 진행됨이 보고되었다.[6)7)]

진주종의 대표적인 특성인 keratin debri의 축적은 각질세포 사멸현상의 증가가 예상되며 이에 대한 연구는 진주종의 병태생리를 밝히는데 필수적인 과정으로 생각된다. Shinoda와 Huang은 진주종상피에서 c-jun와 p53 유전자의 발현을 관찰하여 이들 유전자의 발현이 각질세포의 생

논문접수일 : 1997년 10월 28일 / 심사완료일 : 1998년 1월 12일
교신저자 : 박홍준, 442-749 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5번지 아주대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (0331) 219-5267 · 전송 : (0331) 219-5264
E-mail : hjpark@madang.ajou.ac.kr

사에 관여할 가능성을 보고한 바 있다.[8)]

이에 저자들은 세포의 사멸기전에 대표적인 apoptosis 현상을 진주종상피에서 확인하고 이와 관계된 유전인자를 검출함으로서 진주종상피세포의 세포사멸기전을 밝히고자 수술시 채취한 진주종상피 및 후이개상피를 이용하여 Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP Nick End-Labeling(TUNEL) 염색, 전자현미경의 관찰, DNA의 전기영동과 Fas의 면역화학염색을 이용하여 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

재 료

실험의 재료는 1997년 3월부터 7월까지 아주대학병원 이비인후과에서 수술한 7명의 만성중이염환자에게서 채취한 진주종상피와 후이개상피조직을 사용하였다.

방 법

TUNEL 분석

수술시 채취한 조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀 포매하여 poly-L lysine 도포된 슬라이드에 4 μm 두께로 연속절편하였다. 절편은 xylene을 이용하여 파라핀을 제거하고 재수분화시킨 다음 proteinase K(20 μg/ml, 상온, 30분) 처리하여 투과성을 증진시킨뒤 PBS에서 세척하고(10분, 2회) endogenous peroxidase 작용을 비활성화 시키기 위하여 H_2O_2(3%, 5분)와 반응후 PBS에서 세척하였다. 조직에 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)와 labeling 혼합용액을 투여하고 37℃, 90분간 습한 용기내에서 반응시켰다. 반응종료후 다시 PBS로 세척하고(10분, 3회) anti-FITC HRP conjugate와 37℃, 30분간 반응시켰다. 이상의 반응은 In situ Apoptosis Detection Kit(Takara Shuzo Co., Japan)을 사용하였다. 발색반응은 AEC Substrate-Chromogen System(DAKO, CA, USA)을 이용하여 2 5분간 반응시켰으며 광학현미경하에서 관찰하였다.

투과전자현미경관찰

수술시 채취한 조직을 Karnovsky fixative solution(1% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde, 0.002M calcium chloride, 0.1M cacodylate buffer, pH 7.4)에서 2시간동안 전고정하고 cacodylate buffer로 수세후 1% osmium tetroxide와 1.5% potassium ferrocyanide에서 1시간 동안 후고정한다. 50 100% alcohol로 탈수한 다음 Poly/Bed 812 resin(Pelco)에 포매하여 37℃에서 6시간, 48℃에서 12시간, 60℃에서 24시간동안 중합반응시킨다. 조직을 박편한뒤 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 Zeiss EM 902A 전자현미경하에서 관찰하였다.

Fragmented Genomic DNA의 전기영동분석

진주종상피세포로 부터 fragmented DNA 를 얻기 위하여 수술시 채취한 진주종상피조직을 0.5 ml의 고장성 lysis buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100)을 이용하여 세포를 용해시킨다음 13,000×g에서 5분간 원심분리하여 fragmented DNA가 포함된 상층액을 취하였다. 여기에 5M NaCl(0.1 ml, ice-cold)와 2-propanol(0.7 ml, ice-cold)를 투여하고 영하 20℃에서 밤새 침전시키고 원심분리하여 침전물을 70% alcohol로 세척후 건조시켰다. DNA pellet은 증류수에 녹인후에 1.5% agarose에서 50V, 2시간동안 전기영동후 ethidium bromide에 염색하고 UV lamp에서 관찰하였다.

면역조직화학염색

면역조직화학염색은 TUNEL 분석과 동일한 방법으로 준

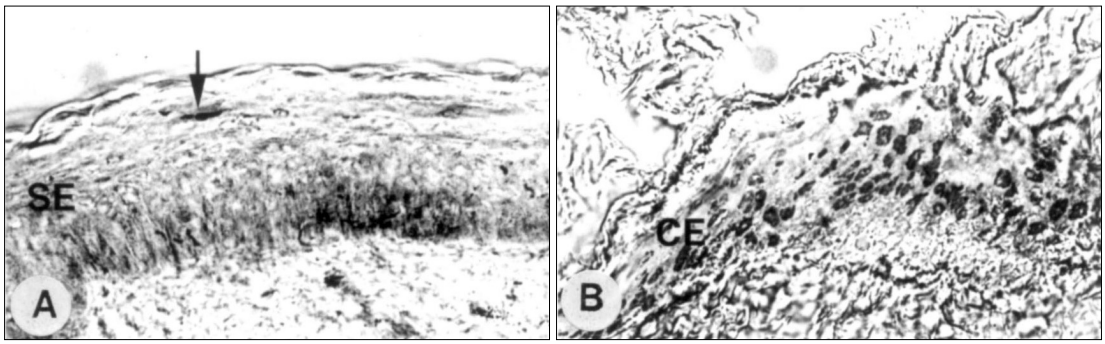

Fig. 1. TUNEL staining of retroauricular skin and cholesteatoma epithelium. A : Nuclei of fragmented chromatin are presented in the granular layer of retroauricular skin (×400) (arrows-keratinocytes in apoptosis) B : Increased number of TUNEL positive nuclei are observed in upper layers of the human cholesteatoma epithelium (×400). SE-epithelium of retroauricular skin, CE-epithelium of cholesteatoma.

비된 조직절편을 H_2O_2(3%, 5분)으로 처리한뒤 Fas의 primary antibody(Santa Cruz, CA, USA)와 4℃에서 밤새 반응시킨뒤 세척하고 Vectastain ABC reagent(Vector, CA, USA)를 사용하여 반응시키고 AEC를 이용하여 발색 반응후 광학현미경하에서 관찰하였다.

결 과

TUNEL염색

진주종상피와 후이개상피의 TUNEL 염색결과 후이개상피에서는 표피층에서 일부 각질세포들이 TUNEL 양성으로 반응함이 관찰되었다(Fig. 1A). 반면 진주종상피에서는 7예 모두에서 상피 상층에 걸쳐서 TUNEL 양성반응세포가 증가됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B).

전자현미경적 소견

TUNEL 양성반응이 관찰되는 부위의 진주종상피에서 투과전자현미경하 관찰한 결과 apoptosis의 특징적인 소견인 세포의 형태는 유지되면서 세포핵이 condensation되는 형태학적인 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

Fragmented Genomic DNA의 전기영동

진주종상피에서 추출한 DNA를 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide염색 관찰 결과 apoptosis의 생화학적 특성으로 알려진 genomic DNA의 nucleosomal bundle 사이의 분리로 인하여 생기는 사다리(“ladder”) 모양의 형태를 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

Fas의 발현양상

면역조직화학반응결과 진주종상피의 상층에서 Fas 양성반응인 기질세포를 관찰할 수 있었으며 이와 대조적으로

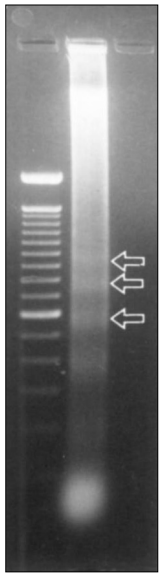

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of genomic DNA from cholesteatoma epithelium. Distinct pattern of fragmented genomic DNA is observed in 1.5% agarose gel electrophoresis with ethidiumbromide staining (Left lane, 100 bp DNA marker ; Right lane, Genomic DNA of human cholesteatoma epithelium) (arrows-typical ladder patterns of fragmented DNA).

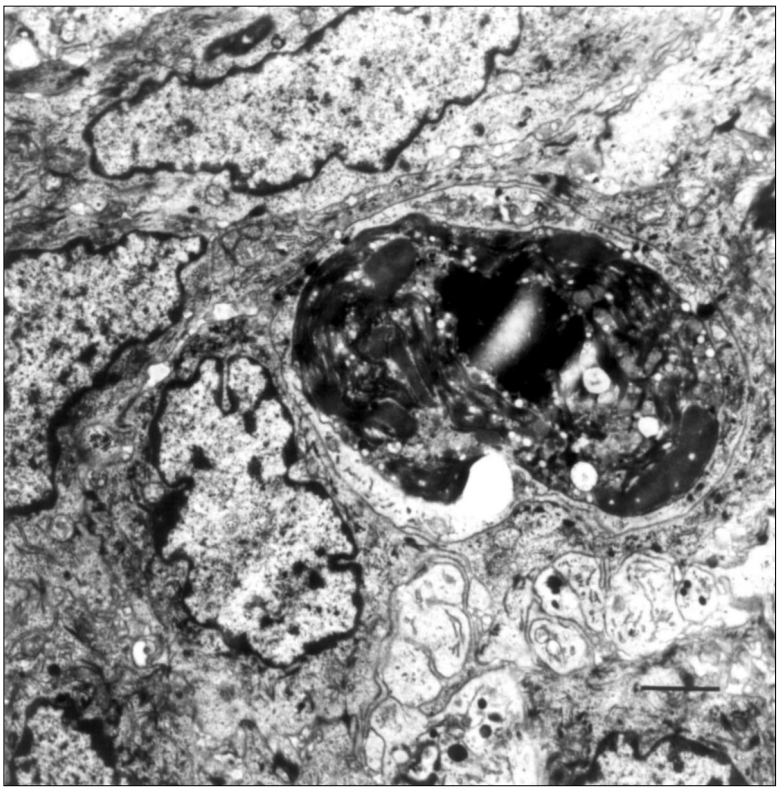

Fig. 2. Photography of transmission electron microscope of the keratinocyte under apoptotic process in cholesteatoma epithelium. Condensation of the chromatin can be observed in the keratinocyte (Scale bar, 1.7 μm).

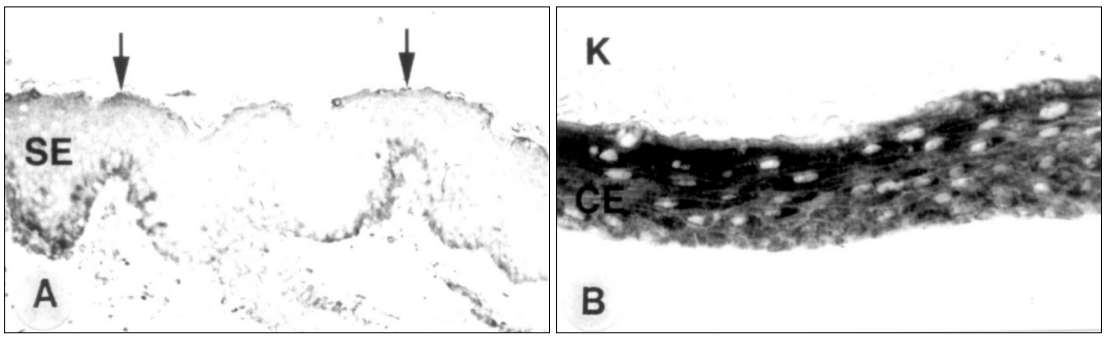

Fig. 4. Immunohistochemical staining of normal retroauricular skin and cholesteatoma epithelium using polyclonal anti-human Fas protein antibody. The reaction was done with avidine-biotin-peroxidase complex and AEC. A : Weak positive staining can be seen only in the keratin layer of normal retroauricular skin (arrows). B : Positive reactions can be found in entire cholesteatoma epithelium (×400) K-Keratin debris of cholesteatoma, CE-cholesteatoma epithelium.

후이개상피에서는 과립층 부위에서만 약한 반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

고 찰

저자들은 본 논문에서 진주종상피에서 일어나는 세포사멸이 정상상피와 차이가 있는지 밝혀보았으며 차이가 있다면 어떠한 기전에 의하여 일어나는지를 알아보려하였다. 일반적으로 세포의 사멸은 크게 necrosis와 apoptosis로 구분된다. Necrosis는 주위의 환경이 악화되었을때 세포가 적응을 하지 못하고 파괴되는 병적인 상태를 말하는 반면, apoptosis는 1974년 Kerr 등[9]에 의해 명명된 용어로서 세포가 능동적으로 죽게되는 개념으로 이 과정에서 RNA와 단백질의 합성을 필요로 한다.[10] 정상 피부상피는 기저층으로부터의 각질세포의 분화와 각질층의 탈락이 지속적이며 균형적으로 이루어진다. 이 과정중 각질세포의 분화와 사멸에 apoptosis가 관여함이 보고되어 있으며 주로 상층부에서 apoptosis 양성반응세포가 관찰된다.[11] 본 연구에서도 후이개피부상피의 TUNEL염색 결과 소수의 양성반응을 보이는 각질세포를 과립층에서 관찰할 수 있었다(Fig. 1A).

진주종상피의 대표적인 특성이 상피의 과증식임은 널리 알려져 있는 사실이다. 이와 관련되어 진주종상피에서 epidermal growth factor와 receptor가 발현됨이 보고되었으며[1-3] 과증식과 관련된 cytokeratin 13, 16등의 발현을 관찰하였다.[4][5] 진주종에서 상피의 과증식과 더불어 또하나의 관점을 이루는 부분은 케라틴 debris의 축적이다. 이와같은 케라틴의 축적이 이루어지려면 각질세포의 사멸이 증가되어야 하고 이에 따른 apoptosis의 현상에도 변화가 있을 것으로 예측할 수 있다.

저자들은 진주종상피에서 TUNEL방법으로 apoptosis가 현저히 증가됨을 확인하였다. TUNEL방법은 apoptosis를 in situ의 방법으로 확인할 수 있지만[12] necrosis가 일어나는 세포와의 비특이적 가양성결과를 완전히 배제할 수 없으므로 반응의 가양성을 배제하기 위하여는 추가적인 확인이 중요하다. Apoptosis에서의 DNA fragmentation은 internucleosomal sites에서 일어나며 생성된 작은 조각의 double-stranded DNA는 전기영동시에 약 200 bp 간격으로 여러 band를 나타내게된다(ladder pattern).[13] 본 실험에서도 진주종상피의 DNA 전기영동결과 ladder pattern을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 이 결과로 진주종상피에서 상당한 양의 DNA fragmentation이 일어나고 있다는 사실을 알 수 있었다. 또다른 apoptosis를 확인할 수 있는 방법으로는 전자현미경적인 관찰을 들수 있다. 전자현미경하에서 apoptosis를 일으키고 있는 세포는 특징적으로 세포의 shrinkage와 염색체의 condensation이 관찰된다.[14][15] 이러한 형태학적인 관찰은 apoptosis를 확인하는 가장 정확한 방법이라 할 수 있지만 초기에 형태학적인 변화를 미처 나타내지 않은 세포의 경우도 고려해야하겠다. 저자들은 TUNEL양성을 나타내고 있는 진주종상피에서 전자현미경상 세포수축 및 염색체의 condensation 현상을 보이는 keratinocyte를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Apoptosis에 관여하는 유전자로는 Fas, p53, bcl-2등을 들 수 있는데 Shinoda와 Huang은(1995) 진주종상피의 과립층에서 p53의 발현을 관찰하고 이것이 apoptosis 조절에 관여할 수 있음을 제시하였다.[8] Tumor necosis factor receptor superfamily 중 하나인 Fas는 세포표면에 발현되며 apoptosis에 관계되는 신호를 전달하는 유전물질로 알려져있으며[16-18] Fas의 발현 증가는 해당세포의 apoptosis를 유발시킬 수 있는 중요한 요건이 된다. p53에 의한 apoptosis는 p53가 직접적으로 관여하던지 혹은 다른 유전인자의 발현을 변화시킴으로서(전사인자로서) 관여

하는 것으로 알려져있다.[19] Fas는 p53이 전사인자로서 작용하여 조 절되는 유전인자로서 apoptosis의 조절에 직접적이고 중요한 역할을 담당하고 있다. 한 예로 In vitro실험에서 p53는 Fas의 발현 증가와 더불어 apoptosis를 유발하였다.[20] 본 실험에서 면역조직화학적 실험결과 정상상피에서는 괴립층에서만 약하게 Fas의 발현을 관찰할 수 있었는데 반하여 진주종상피에서는 상층에서 양성을 나타난 결과로 보아 Fas와 apoptosis의 연관성을 설명해 줄 수 있는 좋은 자료라고 생각된다. 즉 정상적으로 각질세포의 탈락이 관찰되는 후이개상피의 경우 각질층에서만 Fas의 발현이 관찰되고 진주종상피에서는 모든층에서 관찰되며 상층부에서 강하게 관찰된 점은 Fas의 발현과 apoptosis의 밀접한 상관관계를 말해주고 있다.

이상의 연구에서 진주종상피에서 Fas의 증가는 apoptosis에서 Fas 역할의 중요성에 대한 in vivo실험으로서 의미를 부여할 수 있을 것으로 사료되며 정확한 Fas의 작용기전에 대한 추가적인 연구가 진행될 계획이다.

결 론

진주종상피에서 Fas의 발현 및 Apoptosis반응을 나타내는 세포가 정상상피에 비하여 월등히 증가된 양상으로 관찰되었으며 이는 진주종의 특성중의 하나인 과도한 keratin debris 형성의 원인이 되는 각질세포사멸의 증가를 설명할 수 있는 중요한 기전으로 사료된다.

중심단어 : 진주종 · Apoptosis · Fas.

본 논문은 1997년도 오공회 연구비에 의하여 이루어졌음.

REFERENCES

1) Kojima H, Shiwa M, Kamide Y, Moriyama H. *Expression and Localization of mRNA for Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor in Human Cholesteatoma. Acta Otolaryngol (Stockh) 1994;114:423-9.*
2) Kojima H, Matsuhisa A, Shiwa M, Kamide Y, Nakmura M, Ohno T, Moriyama H. *Expression of Messenger RNA for Keratinocyte Growth Factor in Human Cholesteatoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1996;122:157-60.*
3) Bujia J, Holly A, Schilling V, Negri B, Pitzke P, Schulz P. *Aberrant Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Aural Cholesteatoma. Laryngoscope 1993;103:326-9.*
4) Sasaki H, Huang CC. *Expression of cytokeratins 13 and 16 in middle ear cholesteatoma. Otolaryngol Head Neck Surg 1994;110:310-7.*
5) Bujia J, Schilling V, Holly A, Stammberger M, Kastenbauer E. *Hyperproliferation-associated Keratin Expression in Human Middle Ear Cholesteatoma. Acta Otolaryngol (Stockh) 1993;113:364-9.*
6) Budtz PE, Spies I. *Epidermal tissue homeostasis. Cell Tissue Res 1989;256:475-86.*
7) McCall CA, Cohen JJ. *Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes. J Invest Dermatol 1991;97:111-4.*
8) Shinoda H, Huang CC. *Expressions of c-jun and p53 Proteins in Human Middle Ear Cholesteatoma: Relationship to keratinocyte proliferation, differentiation, and programmed cell death. Laryngoscope 1995;105:1232-7.*
9) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. *Apoptosis: A basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239-57.*
10) Tata JR. *Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of tadpole tail in organ culture. Dev Biol 1966;13:77-94.*
11) Polakowska RR, Placentini M, Bartlett R, Goldsmith LA, Haake AR. *Apoptosis in Human Skin Development: Morphogenesis periderm, and stem cells. Developmental Dynamics 1994;199:176-88.*
12) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992;119:493-501.*
13) Wyllie AH. *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 1980;284:555-6.*
14) Kerr JFR. *Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death J Pathol. 1971;105:13-20.*
15) Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. *Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. J Pathol 1984;142:67-77.*
16) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima SI, Sameshima M, *et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell 1991;66:233-43.*
17) Trauth BC, Klas C, Peters AMJ, Matzku S, Moller P, Falk W, *et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science 1989;245:301-5.*
18) Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. *A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. J Exp Med 1989;169:1747-56.*
19) Caelles C, Helmerg A, Karin M. *p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. Nature (London) 1994;370:220-3.*
20) Owen Schaub LB, Zhang W, Cusac JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, *et al. Wild-Type-Human p53 and a Temperature-Sensitive Mutant Induce Fas/APO-1 Expression. Molecular and Cellular Biology 1995;15:3032-40.*